

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. A. Kröncke

pH-Messungen an isolierten
Streptokokkus mutans-Stämmen während
Glukosefermentation in Abhängigkeit
von der Pufferkonzentration

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Walther Würth
aus Eichstätt

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. A. Kröncke

pH-Messungen an isolierten
Streptokokkus mutans-Stämmen während
Glukosefermentation in Abhängigkeit
von der Pufferkonzentration

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Walther Würth
aus Eichstätt

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.1980

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung und Thematik	2
II. Literaturübersicht	6
III. Material und Methoden	15
A. Bakterien	15
1. Charakterisierung der Bakterien	15
2. Anzüchtung der Bakterien	16
B. pH-Registrierung	18
1. pH-Meter und Eichung	18
2. Warburg-Gefäße	18
C. Versuchsdurchführung	19
D. Enzymatische Glukosebestimmung	22
E. Kontrollversuch	22
IV. Ergebnisse und Diskussion	24
V. Zusammenfassung	42
VI. Schrifttum	44

I. Einleitung und Thematik

W.D. MILLER formulierte 1889 die chemisch parasitäre Theorie über die Entstehung der Zahnkaries. Sie wird in ihren Grundzügen noch heute allgemein anerkannt. Diese Theorie postuliert, daß die anorganischen Bestandteile der Zahnhartsubstanzen unter der Einwirkung organischer Säuren, vor allem der Milchsäure, demineralisiert werden. Die Säuren entstehen durch die mikrobielle Fermentation von Kohlenhydraten in der Mundhöhle und in der Zahnplaque auf der Zahnoberfläche. Die hierbei angedeutete wesentliche Rolle der Mikroorganismen bei der Pathogenese der Karies untermauerten ORLAND et al. (1954, 1955) durch Versuche an keimfrei aufgezogenen Ratten. Trotz kariogener Kost blieben die keimfrei gehaltenen Tiere kariesfrei. Erst die Kontamination des sterilen Mundhöhlenmilieus mit zwei Bakterienstämmen führte zum Auftreten kariöser Läsionen. Als kariogen wirkende Mikroorganismen kommen potentiell alle diejenigen in Frage, welche im Rahmen ihres normalen Stoffwechsels saure Abbauprodukte liefern. Die bis heute vorliegenden Ergebnisse der Kariesforschung lassen dabei deutlich erkennen, daß den Plaque-Streptokokken eine zentrale Bedeutung innerhalb der Mikroorganismen der Mundhöhle zukommt. Folgende Gründe sprechen dafür:

1. Nach Untersuchungen über die prozentuale Zusammensetzung der Zahnplaque sollen die Streptokokken 20 - 51 % der Bakterienpopulation ausmachen (GIBBONS et al. 1964). Andere Verfasser sprechen von 70 % α -hämolsysierenden Streptokokken bezogen auf die gesamte Plaqueflora

(STRÅLFORS 1950, FROSTELL 1960). RANKE und RANKE (1970) geben sogar Werte bis zu 96 % der kultivierbaren Plaqueflora an.

2. Viele Arten von Plaque-Streptokokken zeichnen sich durch hohes und rasches Säurebildungsvermögen aus (STRÅLFORS 1950, GIBBONS 1964, GEHRING 1969). Bei hohen Konzentrationen vergärbare Kohlenhydrate verarbeiten sie Glukose homofermentativ, wobei hauptsächlich Milchsäure, die am stärksten azide Carbonsäure dieser Stoffwechselleistung, als Endprodukt entsteht (DRUCKER und MELVILLE 1968, TANZER et al. 1969).
3. Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft der Streptokokken ist ihre Fähigkeit, aus Saccharose extrazelluläre Polysaccharide (EPS) zu synthetisieren (CARLSSON 1965, 1967, GUGGENHEIM 1968, 1970, MONTVILLE et al. 1977), die einen wasserlöslichen Levan- und Dextran- sowie einen wasserunlöslichen Dextrananteil enthalten. Einerseits haben die EPS durch ihre hohe Affinität zum Schmelz adhäsive Fähigkeiten, wodurch eine Anlagerung der Mikroorganismen an Glattflächen möglich wird. Andererseits bilden sie mit Speichelkomponenten unlösliche Komplexe, die als intermikrobielle Plaquematrix und Kohlenhydratspeicher dienen und zur Schaffung anaerober Bedingungen beitragen. Mutanten, denen die Fähigkeit der EPS-Bildung fehlte, zeigten sich im Experiment kaum mehr kariogen (DE STOPPELAAR 1971).
4. Viele Arten der Plaque-Streptokokken produzieren jodophile Polysaccharide, die dem Glykogen-Amylopectin-Typ angehören (GIBBONS und KAPSIMALIS 1963, VAN HOUTE und JANSEN 1968) und intrazellulär (IPS) gespeichert werden. GIBBONS und

SOCRANSKY (1962) und GIBBONS (1964) isolierten aus den Plaques kariesaktiver Personen anteilmäßig mehr Mikroorganismen mit der Fähigkeit große Mengen von Polysacchariden zu speichern, als bei kariesinaktiven Personen. Die IPS dienen als Reservestoffe, die in Abwesenheit von Zuckern fermentiert werden können (KLEINBERG und JENKINS 1964, GIBBONS 1964). Auf diese Weise tragen die kario-genen Mikroorganismen dazu bei, den pH-Wert in der Plaque über längere Zeit gefährlich niedrig zu halten.

Die Möglichkeit, Polysaccharide (EPS und IPS) zu bilden, bleibt aber nicht nur den Streptokokken vorbehalten, sondern ist ebenso bei vielen anderen kultivierbaren Bakterien der Zahnplaque zu finden. Jedoch stehen die Streptokokken aufgrund ihres hohen Säurebildungsvermögens und ihres hohen prozentualen Anteils in der Plaque im Zentrum der bei der Kariesätiologie ablaufenden Prozesse.

Innerhalb der Streptokokken wiederum konzentriert sich das Interesse auf eine Gruppe von Mikroorganismen, die bereits 1924 von CLARKE in Kulturen von Plaquematerial aus kariösen Defekten gefunden und beschrieben wurde und die er Streptokokkus mutans nannte. Die Verbindung von Streptokokkus mutans mit der Kariesätiologie wurde wiederholt aufgezeigt. Man isolierte Streptokokkus mutans häufiger aus Plaquematerial kariesanfälliger Personengruppen als bei Personen mit geringer Kariesanfälligkeit (KRASSE et al. 1968, DE STOPPELAAR et al. 1969, IKEDA et al. 1973). GUGGENHEIM (1968) fand bei Biotypen von Streptokokkus mutans die höchste biochemische

Aktivität. Vergleiche von *Streptokokkus mutans* mit *Streptokokkus sanguis* erbrachten bei *Streptokokkus mutans* Stämmen die höchste Laktatbildung (RANKE et al. 1969, RANKE und RANKE 1970) sowie jeweils EPS- und IPS-Synthese (RANKE und RANKE 1970). Außerdem haben sich in Tierversuchen mit gnotobiotischen Ratten *Streptokokkus mutans* als besonders kariogen erwiesen (MICHALEK et al. 1977).

Derartige Mikroorganismen führen durch die Bildung organischer Carbonsäuren aus vergärbaren Kohlenhydraten im anaeroben Biotyp der Plaque zu einer Auflösung der Zahnhartsubstanzstrukturen. Dies wird durch einen nicht mehr kompensierbaren Anstieg der H^+ -Ionenkonzentration an der Grenze Plaque/Schmelz (oder Dentin) möglich. Die Lösung der Mineralphase setzt erst ein, wenn ein gewisser pH-Wert unterschritten wird. Nach der Literatur liegen die Angaben über diesen "kritischen Wert" meist bei pH 5,5 (STEPHAN 1944, ERICSSON 1949, GEHRING 1969). Jedoch werden Grenzwerte von pH 5,2 (ENGLANDER et al. 1956) bis pH 6,0 (FOSDICK et al. 1953) genannt. Unterhalb dieser Werte wird der Zahnschmelz in vivo angegriffen.

Viele in vivo und in vitro Arbeiten befaßten sich daher mit der Verfolgung des pH-Abfalls nach Gabe von Kohlenhydraten, wobei fast ausschließlich die Zahnplaque im Mittelpunkt stand. Keine uns bekannte Veröffentlichung stellte derartige Untersuchungen bei einzelnen *Streptokokkus mutans* Stämmen an. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung des pH-Verhaltens von 12 isolierten *Streptokokkus mutans* Stämmen bei Glukosefermentation. Zusätzlich wurden die Pufferkapazitäten des anaeroben Versuchsmilieus, ähnlich den Verhältnissen in vivo, variiert.

II. Literaturübersicht

1938 versuchte STEPHAN mit einer mikrokolorimetrischen Methode, die Wasserstoffionenkonzentration in menschlicher Zahnplaque und in Material aus kariösen Kavitäten in vitro mittels Farbindikator zu bestimmen. Mit dieser relativ groben Methode konnte er pH-Werte nachweisen, die mitunter bei pH 4,2 lagen. 1940 verwendete er Glas- und Antimonsulfid-elektroden für in vivo Messungen an Plaque nach Spülung mit 1 %iger Glukoselösung. Dabei zeigte sich innerhalb weniger Minuten ein intensiver pH-Abfall um teilweise 3 pH-Einheiten, was einem Ansteigen der freien H^+ -Ionenkonzentration um das 1000fache entsprach.

Im gleichen Jahr publizierten MILLER et al. Versuche mit Plaqueproben in vitro. In ihren Untersuchungen entwickelten niedermolekulare Zucker wie Maltose, Saccharose oder Glukose stärkere Säurewerte als hochmolekulare Kohlenhydrate wie Stärke. Tiefste pH-Werte wurden bis zu pH 4,17 gemessen.

1944 führte STEPHAN weitere in vivo pH-Messungen an Plaque-material von Kariesaktiven und Kariesinaktiven durch. Seine Bestimmungen erfolgten 2 min nach einer Spülung mit 10 %iger Glukoselösung, nachher in Abständen von 10 min. Die damals gewonnenen Kurven zeigten wiederum einen raschen pH-Abfall in den ersten Minuten nach der Kohlenhydratapplikation, der bei den Kariesaktiven am größten war und am längsten anhielt. Es folgte ein langsamer Wiederanstieg, wobei die Ausgangswerte

nach 60 min fast erreicht wurden. Als die "Stephan-Kurven" gingen sie in die Literatur ein.

ROSEN und WEISENSTEIN (1965) stellten gleichfalls an Plaques von Personen unterschiedlicher Kariesanfälligkeit Messungen über das pH-Verhalten an. Der pH nach Mundspülung mit einer 50 %igen Saccharoselösung lag bei den kariesfreien Probanden um ca. 0,2 pH-Einheiten höher als bei den kariesaktiven. Jedoch fanden sie keinen Abfall unter pH 5,5. 30 min nach Versuchsbeginn stiegen die Werte wieder langsam bis zu dem Ausgangsniveau von ca. pH 6,4. Ähnliche Tiefstwerte erhielten MOORE et al. 1956 mit Plaquematerial bei Verwendung einer 50 %igen Saccharoselösung.

1947 untersuchten STEPHAN und HEMMENS den pH-Abfall verschiedener Bakterienkulturen, darunter zwei nicht näher bezeichnete Streptokokken, im Phosphatpuffer-Milieu nach Glukoseapplikation. Dabei erhielt man pH-Kurven, die denen der Plaque ähnelten, wobei tiefere Werte erzielt wurden, wenn die Glukosekonzentration gesteigert wurde. Ähnliche Ergebnisse gab FROSTELL (1962) für Plaquematerial an, das in Phosphatpuffer suspendiert und mit verschiedenen Glukosekonzentrationen getestet wurde. Die Säureproduktion erreichte ihr Optimum bereits unter sehr niedrigen Zuckerkonzentrationen. Derselbe Autor veröffentlichte 1969 weitere in vivo Untersuchungen über den pH-Abfall in der Plaque bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Dabei konnte schon mit Saccharosekonzentrationen von 5 % eine optimale

Säurebildung erzielt werden. Aus den Ergebnissen schloß FROSTELL, daß die Stärke der Ansäuerung hauptsächlich eine Funktion der einwirkenden Zuckerkonzentration war. Ähnliche Ergebnisse fand KLEINBERG (1961) bei in vivo Studien an Plaque, und 1967 bei einem künstlichen System, bestehend aus zentrifugiertem Speichelsediment und weiteren Speichelkomponenten. Ebenfalls 1967 veröffentlichte NEFF ausführliche in situ Untersuchungen zur Säurebildung aus verschiedenen Kohlenhydraten. Er erzielte typische pH-Kurven, deren Endwerte von der Konzentration der applizierten Lösung bestimmt wurden und teilweise bis in die Nähe von pH 4,0 abfielen.

JORDAN und KEYES (1966) benutzten ein in vitro gezüchtetes Plaquesystem auf einer Glaselektrode, welches den Bedingungen in vivo sehr nahe kam, um die Stoffwechselvorgänge zu untersuchen. Hier wurde die gewachsene Struktur der Plaque nicht, wie bei den bereits erwähnten Arbeiten, durch die Meßmethode zerstört. Die Aziditätsverschiebung der "Plaque" registrierte man nach Eintauchen der Elektrode in 5 %ige Saccharoselösung. Dabei fiel der pH charakteristisch schnell bis in die Nähe von pH 4,0 ab und blieb über längere Zeit auf Werten unter pH 5,0, was eine Speicherung von IPS vermuten ließ.

GRAF und MÜHLEMANN (1966) verwendeten ein Meßsystem, das Bestimmungen von pH-Werten in der Plaque in situ zuließ. Die

mikrobielle Struktur blieb erhalten, ein Eindringen von Speichel auf kapillarem Wege zwischen Elektrode und Plaque ausgeschaltet. Dies wurde durch den Einbau von Miniaturglaselektroden in künstlichen Zahnersatz und Übermittlung der Meßwerte mittels Radiotelemetrie möglich. Die zu untersuchenden Bakterienrasen wuchsen direkt auf der Glaselektrode, meßtechnisch bedingte Störfaktoren blieben ausgeschlossen. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden weitere, einander ähnliche Untersuchungen angestellt (DE BOEVER et al. 1969, DE BOEVER und MÜHLEMANN 1969, GRAF 1969, GRAF und GRAF 1971), die übereinstimmend folgende Ergebnisse erbrachten:

1. Der Nüchtern-pH der Plaque bei normalem Speichelfluß lag zwischen pH 6,5 und 7,3.
2. Nach Spülung mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen erhielt man einen kontinuierlichen pH-Abfall bis unter pH 4,0. Bei Verwendung 10 %iger Saccharoselösung erzielte man die "Stephan-Kurven". Die Tiefstwerte wurden nach 15 - 20 min gemessen. Auch zeigten sich nach 40 min und länger noch keine Anzeichen der pH-Erholung.
3. Ältere Plaques wiesen ausgeprägtere pH-Senkungen auf als jüngere.
4. Stimulierter Speichelfluß führte zu einer markanten Erhöhung der pH-Werte.

Die Auswirkungen von Bicarbonat- und Phosphat-Zusätzen im Zucker auf die Säurewerte der Plaque untersuchten LUOMA

(1966), LUOMA und LUOMA (1968). Dabei zeigte sich, daß die Salzkombinationen im Zucker den pH-Abfall spürbar reduzieren konnten, da sie zu einer Erhöhung der Pufferkapazität des Plaque-Speichel-Milieus beitrugen.

Die Bedeutung des Speichelsystems als Pufferkomponente unterstrichen MUHLER und SHAFER (1954) an Ratten, denen die Speicheldrüsen entfernt worden waren. Die operierten Tiere wiesen eine signifikante Erhöhung des Kariesbefalles auf. ENGLANDER et al. (1959) erhielten nach Elimination des Speichelkontaktes bei pH-Messungen an Zahnplaque stärkere Aziditätswerte, da sich die in Belägen gebildeten Säuren akkumulierten und nicht durch den Speichel neutralisiert werden konnten.

1949 publizierte SELLMAN eine Arbeit über die Pufferwirkung des Speichels. Danach hing die Pufferkapazität von den Konzentrationen der beteiligten Puffersubstanzen Bicarbonat, Phosphat und Eiweiß ab, die ihrerseits vom pH-Wert, dem CO_2 -Druck, der Temperatur und von individuellen Determinanten beeinflußt wurden. Außerdem besaß Reizspeichel eine größere Neutralisationskraft als Ruhespeichel, was auch DREIZEN et al. (1953) feststellten. Die Bedeutung des Bicarbonat-Puffersystems unterstrich WAH LEUNG (1951). Nach seinen Angaben entfielen auf dieses System 85 % der gesamten Pufferkapazität des Speichels im Bereich von pH 7.

Ausführliche Untersuchungen über Puffersysteme der Mundhöhle

veröffentlichte LILIENTHAL (1955). Bezüglich des Speichels bestätigte er die bereits erwähnten Systeme, wobei er ebenfalls dem Bicarbonatsystem die wichtigste Rolle als Puffer zugestand. Innerhalb der Plaque erachtete er die Metabolisierung der organischen Säuren durch Bakterien für am wichtigsten. Zuvor hatte STRÄLFORS (1948) Studien über die Pufferung in der Zahnplaque durchgeführt, in denen er hauptsächlich die Proteine für wichtig hielt. Außerdem konnte er zeigen, daß die Pufferkapazität der Plaque um ein Vielfaches höher lag als die des Speichels. Vor allem in dem Bereich von pH 4 bis 6 war der Unterschied am deutlichsten.

1977 bestimmte TATEVOSSIAN die Pufferkapazität in der extrazellulären Plaquematrix. Danach lag deren Pufferwirksamkeit zwischen der des Speichels und der Gesamtplaque. Drei Komponenten konnten nachgewiesen werden. Über pH 6 war Bicarbonat, wahrscheinlich aus dem Speichel, wirksam. Bei tieferen pH-Werten traten lösliche Proteine und um pH 4 freie Aminosäuren, organische Säuren und funktionelle Gruppen in den Vordergrund.

Den Abtransport der in der Plaque gebildeten Säuren faßte KLEINBERG (1970) in zwei Wegen zusammen:

- physiochemisch: durch Diffusion aus der Plaque, begünstigt durch den Speichel, wobei die Säuren durch Puffer des Speichels und der Plaque neutralisiert wurden.
- metabolisch : durch die Verstoffwechslung in der Plaque durch entsprechende Mikroorganismen.

Neben der schon von MILLER nachgewiesenen Milchsäure tragen auch die übrigen im Rahmen des Kohlenhydrat-Abbaues gebildeten Säuren zu einer Verminderung des pH-Wertes in der Plaque bei. Essigsäure, Propionsäure, Ameisensäure, Isobuttersäure, Buttersäure und Valeriansäure konnten von vielen Autoren in der Plaque nachgewiesen werden (RANKE et al. 1964, GUGGENHEIM 1965, GILMOUR und POOLE 1967, GEDDES 1972, 1975). Bei der Untersuchung des Produktspektrums nach Glukoseabbau von Streptokokkus mutans AHT fanden HU und SANDHAM (1972) außer Ameisensäure und Valeriansäure alle anderen oben genannten Säuren. Zusätzlich wurden Äthanol und CO_2 gebildet. Das Spektrum von Streptokokkus mutans Stamm 249 ermittelten DALLMEIER, BESTMANN und KRÖNCKE (1970). Sie erhielten Werte von 88 Mol% für Milchsäure, 8,5 Mol% für Essigsäure und 3,6 Mol% für Ameisensäure.

Das Produktspektrum änderte sich jedoch hinsichtlich der relativen Mengen von Laktat und den anderen Produkten des Glukoseabbaues, wenn die anaeroben Inkubationsbedingungen variiert wurden. DISTLER und KRÖNCKE (1977) untersuchten bei unterschiedlichen Pufferkonzentrationen das Säurespektrum inkubierter Plaque. Dabei zeigte sich, daß der Anteil von Laktat mit fallender Pufferkapazität zunahm und auch die übrigen Säuren prozentuale Veränderungen aufwiesen. 1979 folgten entsprechende Veröffentlichungen über isolierte Streptokokkus mutans Stämme, die zu ähnlichen Ergebnissen führten. Der Milchsäureanteil nahm mit schwächeren Pufferkonzentrationen auf Kosten von Ameisensäure und Essigsäure zu.

Andere Autoren fanden, daß die Stoffwechselreaktionen der Kohlenhydrat vergärenden Keime von der aktuellen H^+ -Ionenkonzentration abhing. Nach KLEINBERG (1961) lag das pH-Optimum für den Bakterienstoffwechsel bei pH 7,0^{+0,5}. SAUERWEIN (1974) gab für Streptokokken einen Bereich von pH 5,4 bis 7,0 an. STRÄLFORS (1950) berichtete, daß sich die Säureproduktionsrate pro Zelleinheit mit fallendem pH verminderte. Die Säurebildung nahm exponentiell mit dem pH ab und war in dem Bereich von pH 6,5 bis 7,0 annähernd 10mal so stark wie im Bereich von pH 4,5 bis 5,0. Ähnliche Beobachtungen machte FROSTELL (1964).

FUTAKAMI et al. (1976) untersuchten die Laktatbildung aus Glukose an Streptokokkus mutans PK1, einer Mutante davon und an Streptokokkus sanguis NCTC 10904 bei fallenden pH-Werten. Dabei sank die relative Laktatproduktion, bezogen auf pH 7,0, in den azideren Bereichen stark ab und betrug bei pH 4,0 nur noch 8 bis 20 %.

TISCHER (1979) befaßte sich mit dem Laktatbildungsvermögen bei verschiedenen pH-Werten von 11 Streptokokkus mutans Stämmen, die auch für die vorliegende Arbeit zur Verfügung standen. Die pH-Optima für die Milchsäurebildung lagen zwischen pH 6,4 und 8,5, durchschnittlich bei pH 7,2. Generell nahm der Stoffwechsel in extremen pH-Bereichen relativ stark ab.

1977 untersuchten DISTLER und KRÖNCKE den Glukoseabbau an 5 monoinkubierten Streptokokkus mutans Stämmen bei unterschiedlichen Bicarbonat-Pufferkonzentrationen von m/50, m/100, m/150, m/200 und m/250. Während bei der Bicarbonatkonzentration von m/50 jeweils die gesamten Glukosemengen verbraucht wurden, nahm der Glukoseumsatz und damit verbunden die Laktatbildung mit fallenden Konzentrationen ab. Die Pufferkapazität wurde zunehmend früher erschöpft, wodurch der pH der Inkubationsansätze entsprechend stärker abfiel und als limitierender Faktor den Bakterienmetabolismus beeinflusste.

III. Material und Methoden

A. Bakterien

1. Charakterisierung der Bakterien

Für die Durchführung der vorliegenden Untersuchungen standen Reinkulturen von 12 Streptokokkus mutans Stämmen zur Verfügung. Es handelt sich um grampositive, anaerob wachsende Mikroorganismen (SCHLEGEL 1974), deren Stoffwechsel homofermentativ verläuft. Die Glukose wird über den Embden-Meyerhof-Weg abgebaut (DALLMEIER 1970).

Tabelle 1: Verwendete Streptokokkus mutans Stämme

Stamm	Serotyp	Sero-Biotyp	IPS	Herkunft
C2/21		a	-	"TURKU"-Stämme
T3/52		b	+	Prof.
T3/53		c	+	GEHRING ⁺
T5/13		d	+	
T3/67		e	+	
626	a		-	Prof.
634	b		+	GEHRING ⁺
441 =	c		+	Würzburg
NCTC 10449				
620	d		+	
638	e		-	
249			+	
C67/1			+	Prof. DE STOPPELAAR ⁺⁺ Utrecht

⁺ = Prof. GEHRING, Mikrobiologe am Lehrstuhl für experimentelle Zahnmedizin der Universität Würzburg, Sonderforschungsbereich Biologie der Mundhöhle

⁺⁺ = Prof. DE STOPPELAAR, Department of Preventive Dentistry, Laboratory of Microbiology, University of Utrecht

Die Einteilung in Serotypen geht auf BRATTHALL (1970) zurück, der innerhalb der Formengruppe *Streptokokkus mutans* die 5 serologischen Gruppen a, b, c, d und e unterschied. 1974 entwickelten SHKLAIR und KEENE eine biochemische Methode zur Unterscheidung der 5 serologischen Gruppen (= Sero-Biotyp).

2. Anzüchtung der Bakterien

Von jedem der als Stichkulturen in Thioglykolat-Nährböden (Merck Art. 8191) vorliegenden 12 Einzelstämme wurden durch einen Dreiösenausstrich auf Blutagarplatten (Firma Biotest) Reinkulturen angelegt. Die beimpften Platten wurden mit Hilfe des Gas Pak-Systems (Becton, Dickinson und Company) anaerob über 24 Std. im Brutschrank bei 37°C bebrütet und anschließend im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Um ein Überaltern der Kulturen zu verhindern, mußten sie nach spätestens 2 Wochen neu angezüchtet werden.

Die für den jeweiligen Versuch benötigte Bakterienmenge erhielten wir durch Überimpfen des vorgesehenen Stammes von den Blutagarplatten in ein flüssiges Kulturmedium, welches dann 17 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert werden mußte.

Dieser "komplexe" Nährboden (SCHLEGEL 1974) enthielt folgende Substanzen:

20	g	Bacto Tryptose	Difco 0124-01
4	g	Hefeextrakt	Difco 0127-01
2,5	g	Kochsalz	Merck Art. 6404
50	mg	L-Cystin	Difco 0184-15
2,5	g	Dinatriumhydrogenphosphat	Merck Art. 6580
0,6	g	Natriumdihydrogenphosphat	Merck Art. 6346
10	g	Glukose	Merck Art. 8342

Die aufgeführten Quantitäten wurden in einen Erlmeierkolben eingewogen, mit Aqua bidest. ad 1000 cm³ aufgefüllt und unter Erwärmen ungefähr 30 min bis zur vollständigen Lösung mit Hilfe eines Magnetrührwerkes gerührt. Anschließend erfolgte die Verteilung zu ungefähr je 80 ml auf Schraubverschlußflaschen und die Sterilisation im Autoklaven (15 min bei 120°C und 1 atü). Um die zur Durchführung eines Versuches benötigte Bakterienmenge zu erhalten, mußte man 3 Flaschen beimpfen.

Die Nährlösung mit den angewachsenen Mikroorganismen wurde nun 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert und der klare Überstand abgegossen. Zur weiteren Reinigung von Stoffwechselprodukten und verbliebenen Nährlösungsresten erfolgte ein zweimaliges Aufschwemmen mit physiologischer Kochsalzlösung, anschließendes Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes. Das so erzielte Bakteriensediment wurde mit physiologischer

Kochsalzlösung auf eine Dichte mit Transmission = 0,1 im Spektralphotometer (Photometer PMQ II mit Filter M 4 Q III, Carl Zeiss) eingestellt (Wellenlänge = 620 nm, Leerwert = physiologische Kochsalzlösung). Für eine ausreichende Homogenisierung der Suspension sorgte ein Magnetrührgerät.

B. pH-Registrierung

1. pH-Meter und Eichung der Meßelektroden

Die Messung der pH-Werte in den Ansätzen erfolgte durch eine Glaselektrode der Firma Ingold (Typ 402-611). Die aktuellen pH-Werte konnten direkt abgelesen werden (digital pH-meter model 701, Orion research). Ein 6-Kanal Zusatzgerät (elektrode switch model 605, Orion research) ermöglichte das Umschalten zwischen den 5 Glaselektroden und damit das aufeinanderfolgende Ablesen der pH-Werte in den Ansätzen innerhalb kurzer Zeit.

Da der praktischen pH-Skala eine Reihe von Standard-Pufferlösungen zugrunde liegen, war eine Eichung der Meßelektroden nötig. Dies geschah vor jedem Versuch, indem die einzelnen Einstabmeßketten mit Standard-Pufferlösungen von pH 4,0 und pH 6,0 kalibriert wurden.

2. Warburg-Gefäße

Für die Versuche mußten spezielle Gefäße (Sonderanfertigung Firma B. Braun, Melsungen) gefertigt werden, die mit einem dritten Schliff für die Aufnahme der Elektroden versehen und

theoretisch für ein Versuchsansatzvolumen von 10 ml ausgelegt waren (siehe Abbildung 1). Praktisch zeigte sich jedoch, daß beim Schütteln im Warburg-Apparat bei einigen Gefäßen die Ansatzflüssigkeit in das Zentralgefäß floß, die damit der Messung entzogen wurde und daher zu Verfälschungen der Ergebnisse hätte führen können. Die Wahl eines 9 ml Ansatzes eliminierte diese Fehlerquelle.

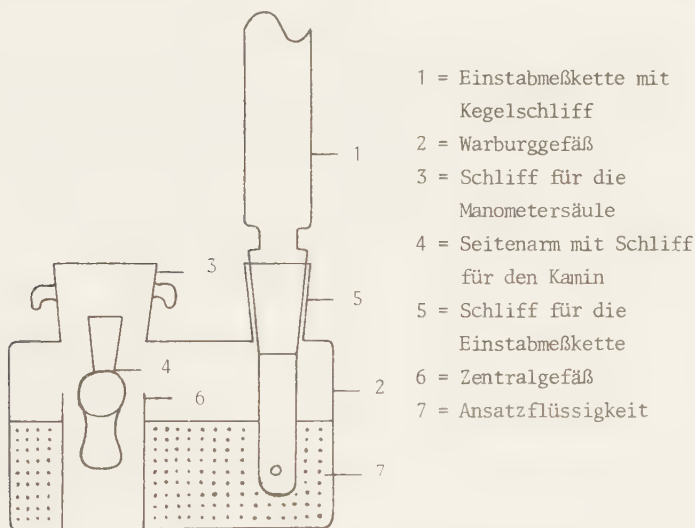


Abbildung 1: Meßanordnung: Warburggefäß mit eingesetzter Meßelektrode

C. Versuchsdurchführung

Die von OTTO WARBURG 1926 entwickelte manometrische Methode zur Beobachtung von mikrobiologischen Stoffwechselleistungen diente als Grundlage für die Durchführung der Versuche. Eine

genaue Beschreibung dieser Methode gaben UMBREIT et al. (1964). Bei den vorliegenden Untersuchungen stand jedoch die Messung der pH-Veränderungen mit Hilfe von Glaselektroden im Mittelpunkt.

Als Puffersubstanz fand das Bicarbonatsystem Verwendung, das im Speichel die wichtigste Pufferkomponente darstellt (SELLMAN 1949, WAH LEUNG 1951, LILIENTHAL 1955). Folgende fünf Pufferkonzentrationen und damit Pufferkapazitäten wurden benutzt:

Natriumhydrogencarbonat (Merck Art. 6325) zu
m/50, m/75, m/100, m/150 und m/200.

Die durch Verdünnung in den Ansätzen wirksamen Konzentrationen betrugen m/100, m/150, m/200, m/300 und m/400. Der pH-Wert der einzelnen Pufferlösungen lag bei $\text{pH } 8,34 \pm 0,04$.

Als Substrat für den Bakterienmetabolismus diente eine Glukoselösung (Glukose Merck Art. 8342) der Konzentration m/25. Da pro Ansatz 1 ml Glukoselösung einpipettiert wurde, betrug die zum Abbau zur Verfügung stehende Menge jeweils $40 \mu\text{Mol}$ oder 7,2 mg.

Zu jedem Durchgang gehörten 5 Ansätze, die untereinander in den fallenden Pufferkonzentrationen m/50, m/75, m/100, m/150 und m/200 differierten. Die Ansätze zu je 9 ml setzten sich wie folgt zusammen:

Pufferlösung	4,5 ml
Bakteriensuspension	3,5 ml
Glukoselösung	1,0 ml (im Seitenarm)

Nach dem Einpipettieren wurden die Gefäße an die Manometersäulen angeschlossen und so in die Warburg-Apparatur (Warburg-Apparat V 166 B. Braun, Melsungen) eingehängt, daß sie vollständig in das auf 37°C erwärmte Wasserbad eintauchten. Nun konnte man die Glaselektroden einsetzen und deren exaktes Funktionieren überprüfen. Zur Herstellung anaerober Bedingungen mußten die Gefäße für 10 min mit einem Gemisch von 95 % N₂ und 5 % CO₂ begast werden.

Der Start des Versuches erfolgte durch Zukippen der Glukoselösung aus dem Seitenarm in die Puffer-Bakterien-Suspension. Die Inkubationszeiten lagen zwischen 80 und 180 min. In dieser Zeit wurden die Ansätze mit einer Frequenz von 80/min geschüttelt. Um möglichst exakte Kurven zu erhalten, war es nötig, die pH-Werte in Abständen von 2 min zu protokollieren. Gegen Ende des Versuches konnten die Intervalle auf 5 min ausgedehnt werden. Die erste Ablesung (= initialer pH-Wert) gab den Zustand nach dem Zukippen der Glukose wieder.

Bei einigen Durchgängen wurde nach Versuchsende die Restglukose bestimmt. Zu diesem Zweck zentrifugierte man die jeweiligen Ansätze 20 min bei 4000 U/min und ermittelte aus dem klaren, zellfreien Überstand auf enzymatischem Wege die Glukosemengen.

Um aus den Versuchen Schlußfolgerungen abzuleiten, waren Ergebnisse notwendig, deren Reproduzierbarkeit innerhalb gewisser Toleranzbereiche nachgewiesen werden konnte. Daher wurden von jedem Streptokokkenstamm mindestens zwei, teilweise

auch bis zu vier Durchgänge gestartet. Sämtliche Meßwerte wurden tabellarisch festgehalten und graphisch umgesetzt (Auszüge siehe IV).

D. Enzymatische Glukosebestimmung

Sie erfolgte mit der Test-Kombination Glukose (Boehringer Diagnostika Best. Nr. 124028). Basierend auf der GOD-Period-Methode kam es in den Meßansätzen nach zwei enzymatisch herbeigeführten Reaktionsschritten zur Bildung eines Farbstoffes, dessen Extinktion gegen die eines Standards im Photometer (Eppendorf Photometer 6120) bei einer Wellenlänge von Hg 578 nm gemessen wurde.

Reaktionsgleichungen:



GOD = Glukoseoxydase; POD = Peroxydase

Die bei dieser Meßmethode übliche Fehlerbreite kann nach Erfahrungen von biochemischen Laboratorien bis zu $\pm 10\%$ betragen. Bei den hier durchgeführten Messungen kam es weniger auf eine quantitative, sondern mehr auf eine qualitative Aussage an.

E. Kontrollversuch

Um eine Vorstellung von der Fehlerbreite zu erhalten, wurde mit Hilfe zweier Kontrollversuche die Genauigkeit der Ver-

suchsdurchführung, d.h. der Gesamtheit der am Ablauf beteiligten Einzelkomponenten, untersucht. Dazu gehörten die Fragen nach der:

1. Übereinstimmenden Messung der 5 geeichten Elektroden
2. Homogenität der Bakteriensuspension
3. Genauigkeit des Pipettierens.

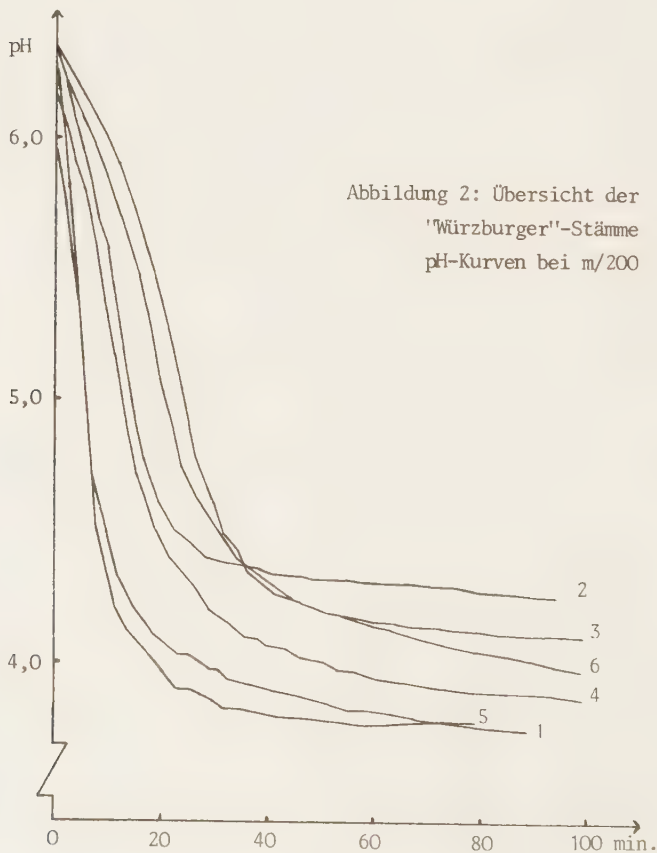
Die Versuche erfolgten nach der beschriebenen Methode mit den Stämmen 441 und T3/52. Alle Ansätze wiesen jedoch dieselbe Pufferkonzentration von m/100 auf, waren somit identisch und hätten bei gleichzeitiger Ablesung analoge pH-Werte aufweisen müssen. Wie sich zeigte, differierten die zeitlich einander entsprechenden Werte sowohl bei dem Durchgang mit Stamm 441 als auch bei Stamm T3/52 um maximal 0,06 pH-Einheiten (siehe Tabelle 2). Diese Abweichungen ließen nicht auf eine gravierende Unzulänglichkeit bei den Einzelkomponenten (Meßelektroden, Bakteriensuspension, Pipettieren) schließen und gewährleisteten für die weiteren Untersuchungen hinreichende Genauigkeit mit einer Fehlerbreite von ca. $\pm 0,03$ pH-Einheiten.

t in min	1	2	Ansatz Nr. 3	4	5	maximale Differenz
0	6,66	6,70	6,65	6,70	6,71	0,06
6	6,32	6,37	6,34	6,38	6,38	0,06
12	6,01	6,04	6,03	6,05	6,04	0,04
18	5,48	5,53	5,52	5,51	5,49	0,05
24	4,74	4,76	4,80	4,76	4,75	0,06
30	4,42	4,45	4,46	4,45	4,46	0,04
36	4,27	4,29	4,30	4,32	4,30	0,05
42	4,18	4,20	4,20	4,22	4,19	0,04
48	4,12	4,11	4,13	4,14	4,13	0,03
54	4,06	4,06	4,07	4,10	4,06	0,04
60	4,02	4,01	4,02	4,04	4,04	0,03

Tabelle 2: Kontrollversuch mit Stamm T3/52
Bicarbonatpuffer m/100

IV. Ergebnisse und Diskussion

Einen Überblick über das pH-Verhalten der 12 untersuchten *Streptokokkus mutans* Stämme bei der Glukosefermentation geben die Abbildungen 2 und 3. Zur Charakterisierung jedes einzelnen Stammes dient die entsprechende pH-Kurve der Pufferkonzentration m/200. Die Kurven werden in den Einzelergebnissen näher erklärt.



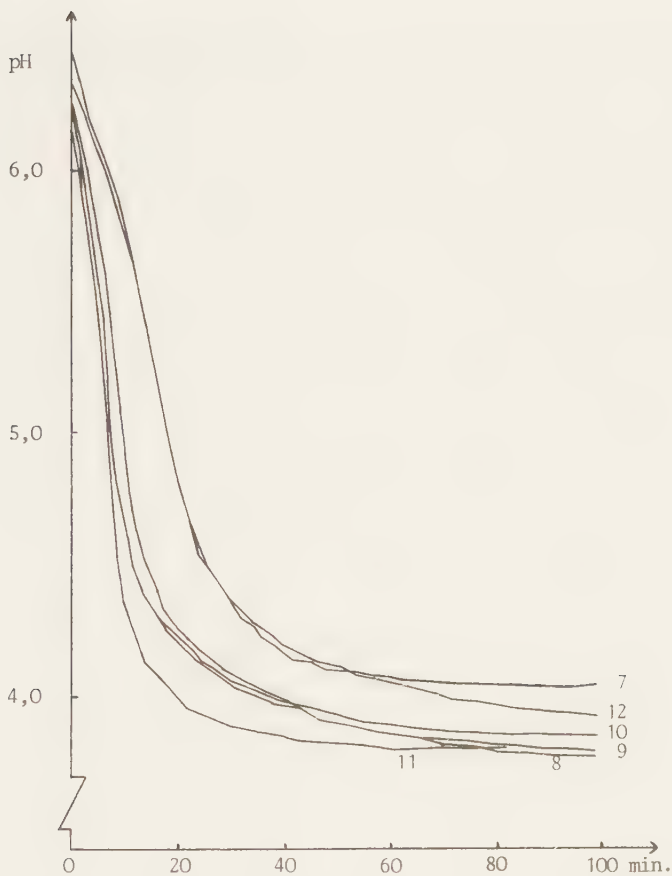


Abbildung 3: Übersicht der "TURKU"-Stämme und C67/1
pH-Kurven bei m/200

1 = 249	7 = C67/1
2 = 626	8 = C2/21
3 = 634	9 = T3/52
4 = 441	10 = T3/53
5 = 620	11 = T5/13
6 = 638	12 = T3/67

Im einzelnen erbrachten die an 12 Streptokokkus mutans
Stämmen durchgeführten Untersuchungen folgende Ergebnisse:

1. Es kann bereits vor Versuchsbeginn eine pH-Verschiebung bis zu leicht sauren Werten beobachtet werden.

Während die pH-Werte der frisch angesetzten Bicarbonat-Pufferlösungen bei $\text{pH } 8,34 \pm 0,04$ liegen, bewegen sich die initialen Messungen der Versuchsansätze, abhängig von der Pufferkonzentration, zwischen $\text{pH } 5,95$ und $7,05$. Bereits nach dem Einsetzen der Elektroden, noch vor dem Begasen, registriert man Werte unter $\text{pH } 8,0$. Dies kann nur als Wirkung einer bereits aziden Bakteriensuspension auf die Pufferlösung interpretiert werden. Daher wurden vor dem Einpipettieren in die Warburg-Gefäße die Säuregrade der einzelnen Bakteriensuspensionen bestimmt. Tabelle 3 zeigt die ermittelten Werte - Durchschnitt mindestens zweier Messungen - für die jeweiligen Stämme:

Stamm	pH-Wert	Stamm	pH-Wert
626 ⁺	4,85	C2/21 ⁺	4,20
634	4,57	T3/52	4,48
441	4,23	T3/53	4,17
620	4,53	T5/13	4,62
638 ⁺	4,56	T3/67	4,48
249	4,32	C67/1	5,20

Tabelle 3: pH-Werte der Bakteriensuspensionen

⁺ = Stämme mit IPS negativ

Den niedrigen Werten zufolge, müssen bereits saure Stoffwechselprodukte vorliegen. WENDEL ermittelte bei anaerober Inkubation ohne Zugabe von Substrat von 10 hier verwendeten Stämmen die gebildeten Laktatmengen. Die enzymatische Analytik ergab Laktatwerte zwischen $2,9 \mu\text{Mol}$ und $9,1 \mu\text{Mol}$. Zusätzlich muß noch mit Ameisensäure und Essigsäure gerechnet werden, die hier nicht bestimmt wurden. Über die Herkunft der Säuren lassen sich folgende Aussagen treffen:

- Während der Anzüchtung haben die Keime Gelegenheit, aus der Glukose der Nährlösung Energiereserven in Form von IPS anzulegen, die gegebenenfalls für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels herangezogen werden. Die Bildung von Milchsäure aus IPS zeigte GIBBONS (1964). Über diesen Weg wäre eine für die gemessenen Werte ausreichende Säurebildung möglich und muß in Betracht gezogen werden. Jedoch erhält man auch von den Stämmen C2/21, 638 und 626, die keine IPS synthetisieren können, entsprechend niedrige Werte, was auf das Vorliegen eines weiteren Mechanismus schließen läßt, der wahrscheinlich auch bei den anderen Stämmen eine Rolle spielt.
- Als zweite Möglichkeit kommt eine Säureproduktion aus extrazellulär gespeicherter Glukose in Frage. Wie bereits erwähnt, stellt die Synthese von EPS eine herausragende Eigenschaft der Streptokokken dar (GUGGENHEIM 1968, 1970, MONTVILLE et al. 1977).

Hauptsächlich die wasserunlösliche Fraktion (Domination von α 1,3-Bindungen) der EPS dürfte durch das zweimalige Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung nicht von den Bakterien getrennt werden können. Über entsprechende Dextranasen bleibt die polymere Glukose dem Bakterienmetabolismus zugänglich. Die Bestätigung einer Säurebildung aus wahrscheinlich extrazellulär gespeicherten Polysacchariden erbrachten DISTLER und KRÖNCKE (1979). Sie untersuchten 12 reine, auf Saccharose-Nährböden angezüchtete Streptokokkus mutans Stämme hinsichtlich deren Milchsäurebildung bei anaerober Inkubation ohne Substrat. Dabei erhielt man mitunter beträchtliche Mengen Laktat, was auf das Vorhandensein und die Induktion zellgebundener Dextranasen schließen ließ. Die Befunde lassen sich jedoch nicht direkt auf die vorliegende Arbeit übertragen, da unsere Nährmedien keine Saccharose enthalten und die EPS-Bildung meist an das Vorhandensein von Saccharose gekoppelt wird. Andererseits wird die Bildung von EPS aus Glukose diskutiert (BÖßMANN 1979).

Eine definitive Aussage über die Herkunft der Säuren in den Bakteriensuspensionen kann im Rahmen dieser Arbeit nicht gesehen werden, da hierfür weitergehende Untersuchungen über den IPS- und EPS-Stoffwechsel nötig wären.

Während des 10minütigen Begasens mit dem N_2/CO_2 -Gemisch erfolgt der restliche pH-Abfall, wodurch ein weiterer Teil der Pufferkapazität verbraucht wird. Den Effekt der Ansäuerung durch die Begasung erörterte TISCHER (1979) näher. Durch den erhöhten CO_2 -Partialdruck kommt es zu einer vermehrten physikalischen und letztlich chemischen Lösung des Kohlendioxyds in der Inkubationsflüssigkeit. Dabei entsteht Kohlensäure. Schließlich werden durch Dissoziation H^+ -Ionen freigesetzt, der pH-Wert sinkt ab.

2. Der pH-Abfall verläuft bei den einzelnen Stämmen verschieden schnell und intensiv.

Dies muß als individuelle Variation gedeutet werden, wobei die stammspezifischen Eigenschaften die entscheidende Rolle spielen. Die zeitlichen Differenzen betreffend, kommen unterschiedliche Aktivitäten der am Glukosestoffwechsel beteiligten Enzymsysteme der jeweiligen Streptokokken in Betracht. Da die Milchsäure aus der Glukose auf dem Embden-Meyerhof Wege gebildet wird, steuert die Aktivität der Aldolase die Umsatzgeschwindigkeit, da dieses Ferment eines der wichtigsten Enzyme für den Glukoseabbau darstellt. BRAMSTEDT et al. (1964) zeigten in ihren Versuchen, daß bei starken Milchsäurebildnern eine entsprechend hohe Aktivität der Aldolase vorlag.

Abweichungen bezüglich der erreichten Tiefstwerte können durch die differierenden Säurespektren der Einzelstämme

hervorgerufen werden. Wie bei IV 4. näher erläutert, liegen für 11 der 12 Stämme entsprechende Untersuchungen über die Zusammensetzung der sauren Abbauprodukte des Glukosestoffwechsels vor. Außerdem dürfte auch eine unterschiedliche pH-Abhängigkeit der Enzymsysteme der jeweiligen Keime, die letztlich die Menge der verbrauchten Glukose beeinflußt, für Variationen verantwortlich sein (siehe IV 6.).

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen die Beziehung der 12 Stämme untereinander. Dabei lassen sich hinsichtlich ihrer Abfallsgeschwindigkeit, damit Aktivität, zwei Gruppen bilden. Würde man beide Darstellungen übereinander projizieren, könnte man erkennen, daß 6 Stämme eine in weiten Bereichen fast gleichlaufende pH-Abfallskurve zeigen. Dazu gehören 249, 620, C2/21, T3/52, T3/53 und T5/13. Die restlichen Stämme zeigen einen erkennbar langsameren pH-Abfall. Auch ist aus diesen Abbildungen ersichtlich, daß die schnellsten Stämme die tiefsten Endwerte erzielen. Diese liegen zwischen pH 3,76 und 3,84 für die Bicarbonat-Konzentration von m/200. In der Abbildung 4 findet sich ein typisches Beispiel für die Gruppe der schnelleren Keime. Stamm 249 erwies sich in früheren Untersuchungen (MESCHÉDE 1969, GEHRING 1969) als besonders aktiv.

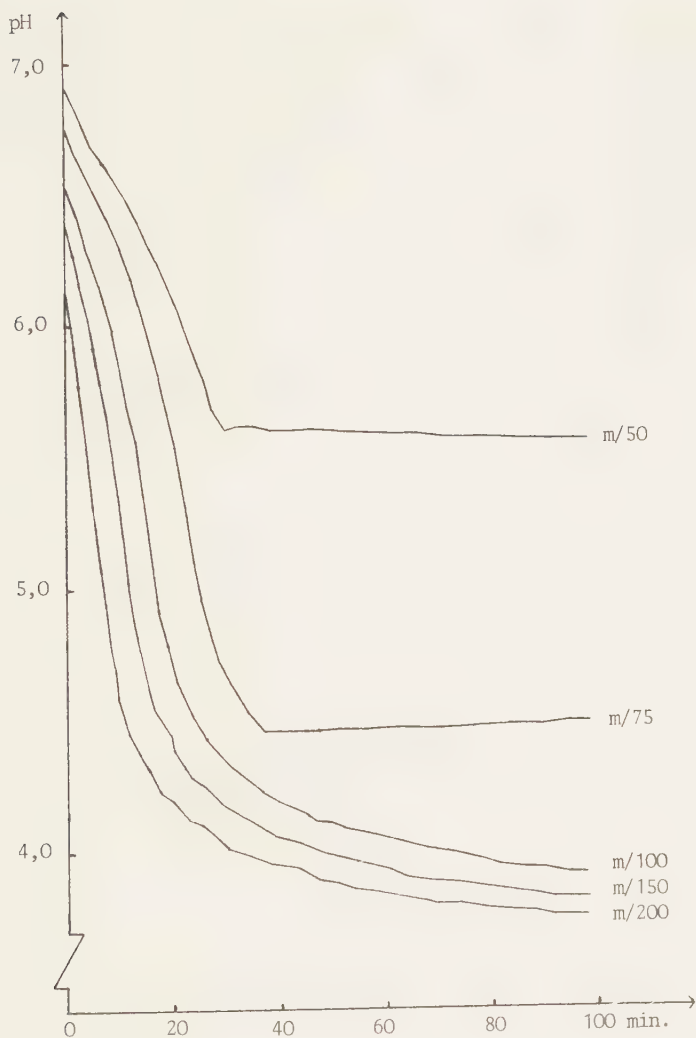


Abbildung 4: pH-Kurven von Stamm C2/21



Abbildung 5: pH-Kurven von Stamm 626

Zu den langsameren Stämmen gehören 441, 638, T3/67, C67/1, 626 und 634. Innerhalb dieser Gruppe zeigen die drei letztgenannten die höchsten End-pH-Werte. bei der Pufferkonzentration von m/200 liegen alle Messungen über pH 4,0. Stamm 626 erreicht sogar nur pH 4,25. Nach DISTLER und KRÖNCKE (1979) befinden sich 626 und 634 mit einem Milchsäureanteil von 81 Mol% bzw. 82 Mol% im Säurespektrum auch an der unteren Grenze aller untersuchten *Streptokokkus mutans* Stämme. In der Abbildung 5 ist das Kurvenverhalten eines langsamen Stammes dargestellt.

Versucht man, eine Beziehung zwischen den Sero- und Sero-Biotypen und deren Aktivität herzustellen, so ergibt sich keine eindeutige Zuordnung. Lediglich bei den d-Typen und den e-Typen finden sich jeweils Übereinstimmungen. Jedoch schließt die Tatsache, daß nur zwei Stämme eines jeweiligen Typs untersucht wurden, eine definitive Aussage aus.

Ein Vergleich der Abbildungen 2 und 3 zeigt ein deutliches Mehr an aktiveren Keimen bei den "TURKU"-Stämmen. Wahrscheinlich spielt das Alter der einzelnen Kulturen eine Rolle. Die "Würzburger"-Stämme wurden wesentlich früher aus Plaque-material isoliert als die "TURKU"-Stämme und könnten folglich in stärkerem Maße durch Mutationen beeinflußt sein.

3. Die Stärke und der zeitliche Verlauf des pH-
Abfalles steht in Abhängigkeit von der verwen-
deten Pufferkonzentration.

Mit fallenden Pufferkonzentrationen erhält man zunehmend azidere Ausgangs- und Endwerte. Daneben nimmt die Steilheit der Kurven zu. Die initialen pH-Werte bewegen sich zwischen pH 5,95 und 7,05 und liegen in der Mehrzahl der Fälle in dem Bereich von pH 6,5 bis 7,0, der von GRAF (1969) und GRAF und MÜHLEMANN (1966) für die Nüchtern-Plaques angegeben wird. Die Abbildungen 4 und 5 zeigen als Beispiele die Kurven von zwei Stämmen. Bei der stärksten Bicarbonat-Konzentration kann das Anwachsen der freien H^+ -Ionenkonzentration und damit eine pH-Senkung durch den Puffer noch wirksam kompensiert werden. Nur bei den Stämmen 249 und 441 beobachtet man ein Absinken des Wertes unter den für den Schmelz kritischen Wert von pH 5,5 (GEHRING 1969). Mit abnehmender Konzentration erweisen sich die Puffer als immer insuffizienter. Das Anwachsen der H^+ -Ionen erschöpft die Pufferkapazität in zunehmendem Maße. Als Folge fällt der pH-Wert bei dem schwächsten Puffer von m/200 in manchen Fällen bis unter pH 3,8. Versucht man dieses Ergebnis auf die in vivo herrschenden Verhältnisse zu übertragen, so kann man sagen, daß in jüngeren Plaques ein Zustand vorliegt, der dem ausreichender Pufferung ähnelt. In älteren und dickeren Plaques dürfte dagegen eine unzulängliche Pufferung anzutreffen sein. Abbildung 6 zeigt kontinuierliche

pH-Messungen an Interdentalplaques verschiedenen Alters (GRAF 1969). Während bei der 1 Tag alten Plaque nur ein pH-Abfall auf ungefähr pH 5 festzustellen ist, bewegen sich die Endwerte bei den älteren Plaques unter pH 4,0. Nach GRAF und MÜHLEMANN (1966) und GRAF (1969) können in die jüngeren Plaques die Puffersubstanzen des Speichels leichter hineindiffundieren und die gebildeten Säuren wirksamer neutralisieren. Bei älterer Plaque dagegen wird die Diffusion von Speichel in die Beläge und von gebildeten Säuren aus den Belägen vor allem in den tieferen Bereichen ungenügend bleiben. Zusätzlich ermöglicht die größere Bakterienmenge eine rapidere Säureproduktion. Gleichlautende Feststellungen machte KLEINBERG (1970). Nach STRÄLFORS (1950) spielt vor allem die Belagdicke eine Rolle, es kommt zu einem Diffusionsgefälle. Die Aussagen lassen sich damit insoweit verfeinern, als man sagen kann, daß vor allem in dickeren Plaques an der Grenze zum Speichel eine ausreichende Pufferung vorliegt, es aber mit zunehmender Tiefe zu einem Puffergefälle kommt, wobei an der Grenze Plaque / Schmelz die insuffizienteste Pufferung anzutreffen ist. Die von uns ermittelten Kurven können somit als Abbild eines derartigen Puffergefälles gewertet werden.

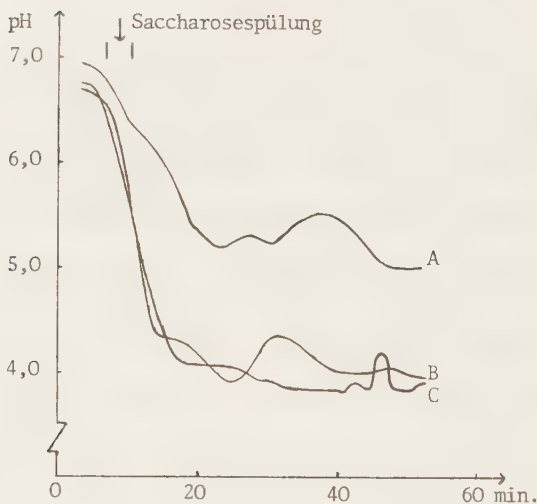


Abbildung 6: pH-Veränderungen nach 4 min. Spülen mit 10 ml 10 %iger Saccharoselösung. Interdentalplaque mit zunehmenden Alter: 1 Tag (A), 2 Tage (B), 3 Tage (C)
(Nach GRAF 1969)

4. Die in vitro gefundenen pH-Kurven für die einzelnen Stämme weisen die typische in vivo ermittelte Verlaufsform auf.

Ausgehend von den jeweiligen initialen Werten verläuft der pH-Abfall zunehmend schneller, erreicht die größte Steilheit und verlangsamt sich dann zusehends, bis ein fast waagrechtlicher Teil nur noch eine geringfügige pH-Verminderung anzeigt. Die pH-Kurven dürfen fast ausschließlich als eine Funktion der entstehenden Milchsäure gewertet werden.

DISTLER und KRÖNCKE (1979) ermittelten bei 10 der 12 hier

verwendeten Stämme (außer 249 und C67/1), DALLMEIER, BESTMANN und KRÖNCKE (1970) für Stamm 249 das Säurespektrum. Danach liegt der Anteil der Milchsäure bei 81 Mol% bis 96 Mol%, den Rest bilden Ameisen- und Essigsäure. Andere Abbauprodukte wie Propionsäure oder Buttersäure, wie sie HU und SANDHAM (1972) für *Streptokokkus mutans* AHT angaben, konnten in keinem Falle nachgewiesen werden. Die rapide Säurebildung, dokumentiert durch die pH-Änderung, setzt sofort nach dem Zukippen der Glukose ein.

Die kontinuierlich bestimmten pH-Kurven der isolierten Streptokokken ähneln den Kurven, die von vielen Autoren mit Plaque-material erzielt wurden. Die Ergebnisse der Schweizer Forschergruppe um GRAF und MÜHLEMANN dürften mit denen der vorliegenden Arbeit am besten vergleichbar sein, da sie mit Hilfe der Radiotelemetrie die pH-Veränderungen in der Plaque in vivo ebenfalls kontinuierlich aufzeichneten. Abbildung 6 zeigt derartige Messungen. Wie deutlich zu erkennen ist, besitzen sie dieselbe signifikante Verlaufsform wie die von uns ermittelten Kurven. Ebenso werden Tiefstwerte erreicht, die in den von uns gemessenen Bereichen liegen. Der Vergleich läßt sich zwar ziehen, doch sind die jeweiligen Bedingungen grundlegend verschieden, unter denen die Ergebnisse erzielt wurden. In den Plaque finden wir eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen, die einander auf komplizierte synergistische und antagonistische Weise beeinflussen. Diese Bakterienflora übertrifft hinsichtlich der Zeit und Quantität der Säurebildung die isolierten Mikroorganismen beträchtlich (SAUERWEIN

1974). Darin dürfte auch der Grund zu suchen sein, weshalb die tiefsten pH-Werte in der Plaque bereits nach wenigen Minuten auftreten, während die hier in vitro inkubierten Einzelstämme diese Werte erst beträchtlich später erreichen. Andererseits unterscheidet sich auch das für den pH-Abfall verantwortliche Säurespektrum der Plaque von dem isolierter Streptokokken qualitativ und quantitativ. Zusätzlich zu den genannten Säuren finden sich Propionsäure und geringe Mengen Buttersäure. Daneben reduziert sich der Anteil an Laktat zu Gunsten der übrigen Säuren (DISTLER und KRÖNCKE 1979).

5. Die Untersuchungen waren hinsichtlich der erreichten pH-Werte sehr gut, hinsichtlich dem zeitlichen Verlauf manchmal schlecht reproduzierbar.

Die Endwerte hängen weitestgehend von dem individuellen Produktspektrum des einzelnen Stammes und der zur Verfügung stehenden Substratmenge ab. Daher liegen die entsprechenden pH-Werte bei verschiedenen Durchgängen auf dem gleichen Niveau. Dagegen bestimmt die Anzahl lebensfähiger Keime die pro Zeiteinheit gebildete Säuremenge, die sich als entsprechend steiler pH-Abfall manifestiert. Um gleiche Voraussetzungen zu haben, werden die Bakterien nach 17 Std. Bebrütung in der stationären Phase ihrer Wachstumskurve geerntet. Identische Bedingungen träfen jedoch nur zu, wenn man mit synchronisierten Kulturen (SCHLEGEL 1974), d.h. mit gleichen Zellteilungs-raten arbeiten würde. Da diese aufwendige Technik von uns nicht angewendet wurde, muß man mit zeitlichen Verschiebungen

auf der Wachstumskurve rechnen. Nach SCHMID (1974) ändert sich dann das Verhältnis lebender zu toter Keime, die Säureproduktion pro Zeit nimmt mit zunehmendem Alter der Kulturen ab.

6. Die verbrauchte Glukosemenge steht in Abhängigkeit von der herrschenden Bicarbonat-Konzentration.

Bei 6 Stämmen wurde nach Versuchsende die noch in den Ansätzen vorhandene Glukosemenge enzymatisch bestimmt. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse in Mol% der umgesetzten Glukose (100 % = 40 μ Mol):

Pufferkonzentration	Glukoseumsatz %					
	441	626	C67/1	249	T5/13	C2/21
m/50	100	100	100	100	100	100
m/75	100	100	100	100	100	100
m/100	80,6	77,7	90,3	100	94,3	100
m/150	70,5	52,5	76,6	74,3	78,9	82,4
m/200	53,0	37,3	61,2	49,3	57,8	58,7

Tabelle 4: Verbliebene Restglukose in Mol% von 6 Stämmen

Die Glukose wird bei allen 6 Stämmen bei den Pufferkonzentrationen von m/50 und m/75 zu 100 % verbraucht. Bei 249 und C2/21 ist dies ebenso bei m/100 noch der Fall. Mit weiter abnehmender Konzentration des Bicarbonats reduziert sich entsprechend die fermentierte Glukosemenge. Betrachtet man die Abbildungen 4 und 5, so erkennt man bei den zu m/50 und

m/75 gehörigen Kurven ein abruptes Ende des pH-Abfalles. Auch bei den restlichen hier nicht abgebildeten Stämmen findet sich dieses Kurvenverhalten, das eindeutig dem Ende des Glukoseumsatzes entspricht. Bei den pH-Kurven der restlichen drei Pufferkonzentrationen beobachtet man in keinem Fall ein plötzliches Ende der pH-Verminderung, die Steilheit nimmt jeweils exponentiell ab.

Gleichlautende Ergebnisse über den Glukoseumsatz von in vitro inkubierten Einzelstämmen und von Plaque bei variabler Pufferkonzentration veröffentlichten DISTLER und KRÖNCKE (1977, 1978). Diesen Resultaten liegt wahrscheinlich ein biochemischer Regelmechanismus zugrunde. Dabei wird beim Verlassen des pH-Optimums und Erreichen azider Werte die Aktivität eines oder mehrerer Enzymsysteme zunehmend eingeschränkt, wodurch die Säureproduktionsrate immer stärker abnimmt (STRÄLFORS 1950, FUTAKAMI et al. 1976, TISCHER 1979). Das Ausmaß des Aktivitätsverlustes dürfte wiederum eine Eigenheit des jeweiligen Stammes sein, was sich aus Tabelle 4 schließen läßt.

Wie die Experimente zeigen, erschöpfen sich die Puffer umso früher, je geringer die Bicarbonat-Konzentrationen werden. Dies schlägt sich in abfallenden pH-Werten und offensichtlich auch Enzymaktivitäten nieder. Bei den schwächsten Puffern werden die pH-Bereiche guter Stoffwechselbedingungen so schnell verlassen, daß ein großer Teil der zur Verfügung

stehenden Glukose nicht verwertet werden kann.

Auf die Plaque übertragen bedeutet dies, daß in den tiefen, schmelznahen Bereichen die durch Diffusion gemäß dem starken Konzentrationsgefälle verfügbaren Kohlenhydrate durch Fermentation nur zum Teil verbraucht werden, der pH jedoch wegen mangelnder Pufferkapazität tiefe Werte erreicht. Der Rest an vergärbaren Zuckern steht dem reduzierten Stoffwechsel über längere Zeit zur Verfügung, wodurch der pH niedrig gehalten werden kann. Diese Überlegung korreliert mit den Plaque-Messungen von GRAF (1969), DE BOEVER und MÜHLEMANN (1969) sowie GRAF und GRAF (1971), die auch nach 40 min und länger nach Zuckerbehandlung keine Anzeichen einer pH-Erholung feststellen konnten.

V. Zusammenfassung

12 Streptokokkus mutans Stämme wurden bei anaerober Inkubation im Warburg-Apparat untersucht. Über Mikro-pH-Meßketten erfolgte die kontinuierliche Registrierung von pH-Verschiebungen bei Glukosefermentation in den Versuchsansätzen. Verhältnisse unterschiedlicher Pufferung, wie sie in vivo anzutreffen sind, simulierte man durch die Verwendung verschiedener Bicarbonat-Konzentrationen von m/50, m/75, m/100, m/150 und m/200. Bei manchen Stämmen wurde nach Versuchsende die in den Ansätzen verbliebene Restglukose auf enzymatischem Wege gemessen. Zusammenfassend brachten die durchgeführten Untersuchungen folgende Ergebnisse:

1. Der pH-Abfall verläuft bei den einzelnen Stämmen verschieden schnell ab und erreicht unterschiedliche Tiefstwerte. Die schnelleren, also aktiveren Stämme erzielten bei den schwächsten Puffern auch die tiefsten Endwerte, die bei der Pufferkonzentration von m/200 teilweise unter pH 3,8 liegen. Dazu gehören die Stämme 249, 620, C2/21, T3/52, T3/53 und T5/13.
2. Das Ausmaß der pH-Verschiebung hängt von der herrschenden Bicarbonat-Konzentration ab. Mit abnehmender Konzentration erweisen sich die Puffer als

zunehmend insuffizienter, was sich in einem Ansteigen der freien H^+ -Ionenkonzentration manifestiert. Die Messungen mit verschiedenen Pufferkonzentrationen repräsentieren das Puffergefälle innerhalb der Plaque.

3. Die kontinuierlich ermittelten pH-Kurven der Einzelstämme weisen dieselbe Charakteristik auf, wie die in vivo gemessenen Kurven von Plaquematerial. Es werden ähnliche Tiefstwerte erzielt, jedoch brauchen die Streptokokken wesentlich länger, um diese zu erreichen.
4. Der prozentuale Glukoseumsatz variiert mit der wirksamen Bicarbonat-Konzentration. Mit abnehmender Konzentration nimmt auch die fermentierte Glukosemenge ab, da durch einen verstärkten pH-Abfall die für die Enzymaktivität günstigen pH-Bereiche schneller verlassen werden.

VI. Schrifttum

BÖßMANN, K.: Bildung, Zusammensetzung und Stoffwechsel der Plaque und ihre ätiologische Bedeutung für die Entstehung von Karies. Kariesprophylaxe 1: 3 (1979)

DE BOEVER, J., HIRZEL, H.C., MÜHLEMANN, H.R.: The effect of concentrated sucrose solutions on pH of interproximal plaque. Helvet. odont. Acta 13: 27 (1969)

DE BOEVER, J., MÜHLEMANN, H.R.: pH of interproximal plaque with regard to continuous sucrose application. Helvet. odont. Acta 13: 97 (1969)

BRAMSTEDT, F., RANKE, E., NAUJOKS, R.: Experimentelle Beiträge zur Biochemie der Plaques und ihre Beziehung zur Zahnkaries. Advanc. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 2: 173 (1964)

BRATTHALL, D.: Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling streptococcus mutans. Odont. Revy 21: 143 (1970)

CARLSSON, J.: Zooglea-forming streptococci, resembling streptococcus sanguis isolated from dental plaque in man. Odont. Revy 16: 348 (1965)

CARLSSON, J.: Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. Odont. Revy 18: 55 (1967)

- CLARKE, J.K.: On the bacterial factor in the
aetiology of dental caries.
Brit. J. Exp. Path. 5: 141 (1924)
- DALLMEIER, E.: Vergleichende Untersuchungen über
den Glukose- und Hexitstoffwechsel
von Plaque-Streptokokken.
Nat. Diss. Erlangen-Nürnberg (1970)
- DALLMEIER, E., BESTMANN, H.J., KRÖNCKE, A.: Über
den Abbau von Glukose und Sorbit
durch Plaque-Streptokokken.
Dtsch. zahnärztl. Z. 25: 887 (1970)
- DISTLER, W., KRÖNCKE, A.: Influence of buffer and
pH on glucose degradation by cariogenic
streptococci.
Vortrag Rom, 14th CED/IADR
9. Sept. (1977)
- DISTLER, W., KRÖNCKE, A.: Intra- und extrazelluläres
Säurespektrum von in vitro inkubierter
Plaque.
Dtsch. zahnärztl. Z. 33: 629 (1978)
- DISTLER, W., KRÖNCKE, A.: Unterschiede bei der In-
duktion polysaccharidabbauender Dex-
tranase bei Streptokokkus mutans.
Vortrag Marburg, Arbeitsgemeinschaft.
f. Grundlagenforsch. d. DGZMK.
11. Jan. (1979)
- DISTLER, W., KRÖNCKE, A.: Der Stoffwechsel isolier-
ter Streptokokken und Plaque im Ver-
gleich.
Dtsch. zahnärztl. Z. 34: 162 (1979)

- DREIZEN, S. REED, A.J., NIEDERMEIER, W., SPIES, T.D.:
Sodium and potassium as constituents
of human salivary buffers.
J. dent. Res. 32: 497 (1953)
- DRUCKER, D.B., MELVILLE, T.H.: Fermentation end-
products of cariogenic and non-
cariogenic streptococci.
Arch. oral Biol. 13: 365 (1968)
- ENGLANDER, H.R., CARTER, WM.J., FOSDICK, L.S.:
The formation of lactic acid in
dental plaques. III) Caries-immune
individuals.
J. dent. Res. 35: 793 (1956)
- ENGLANDER, H.R., SHKLAIR, I.L., FOSDICK, L.S.:
The effect of saliva on the pH and
lactate concentration in dental
plaques. I) Caries rampant indi-
viduals.
J. dent. Res. 38: 848 (1959)
- ERICSSON, Y.: Enamel-apatite solubility. In-
vestigations into the calcium
phosphat equilibrium between
enamel and saliva and its re-
lation to dental caries.
Acta odont. scand. 8:
Suppl. 3 (1949)
- FOSDICK, L.S., CALANDRA, J.C., BLACKWELL R.Q.,
BURRIL, J.H.: A new approach to
the problem of dental caries con-
trol.
J. dent. Res. 32: 486 (1953)

- FROSTELL, G.: Studies in oral biochemical bacteriology.
Acta odont. scand. 18:
Suppl. 29 (1960)
- FROSTELL, G.: Plaque metabolism and substrate concentration.
Acta odont. scand. 20: 335 (1962)
- FROSTELL, G.: Quantitative determination of the acid production from different carbohydrates in suspension of dental plaque material.
Acta odont. scand. 22: 457 (1964)
- FROSTELL, G.: Dental plaque pH in relation to intake of carbohydrate products.
Acta odont. scand. 27: 3 (1969)
- FUTAKAMI, K., SATO, S., IWAMI, Y.: Lactate formation at various pH-levels by the wild strain of streptococcus mutans PK1, its variant and streptococcus sanguis.
J. dent. Res. 55: 1131 (1976)
- GEDDES, D.A.M.: The production of L (+) and D (-) lactic acid and volatile acids by human dental plaque and the effect of plaque buffering and acid strength on pH.
Arch. oral Biol. 17: 537 (1972)
- GEDDES, D.A.M.: Acids produced by human dental plaque metabolism in situ.
Caries Res. 9: 98 (1975)

- GEHRING, F.: Über das Säurebildungsvermögen und die Lebensfähigkeit von Plaque-streptokokken bei Rohrzuckerkonzentrationen von 5 - 70 %.
Dtsch. zahnärztl. Z. 24: 196 (1969)
- GIBBONS, R.J., SOCRANSKY, S.S.: Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques.
Arch. oral Biol. 7: 73 (1962)
- GIBBONS, R.J., KAPSIMALIS, B.: Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharides by streptococcus mitis.
Arch. oral Biol. 8: 319 (1963)
- GIBBONS, R.J.: Storage of carbohydrate by plaque microorganisms and its relationship to dental caries.
Advanc. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 2: 211 (1964)
- GIBBONS, R.J., SOCRANSKY, S.S., DE ARAUJO, W.C., VAN HOUTE, J.: Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque.
Arch. oral Biol. 9: 365 (1964)
- GIBBONS, R.J.: Bacteriology of dental caries.
J. dent. Res. 43: 1021 (1964)
- GILMOUR, M.N., POOLE, A.E.: The fermentation capabilities of dental plaque.
Caries Res. 1: 247 (1967)
- GRAF, H., MÖHLEMANN, H.R.: Telemetry of plaque pH from interdental area.
Helvet. odont. Acta 10: 94 (1966)

- GRAF, H.: Telemetrie des pH der Interdentalplaque.
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 79: 146 (1969)
- GRAF, H., GRAF, R.: Simplified in vivo pH-measure-
ment of oral microbial deposits.
Helvet. odont. Acta 15: 42 (1971)
- GUGGENHEIM, B., ETTLINGER, L., MÜHLEMANN, H.R.:
Die Wirkung von flüchtigen Säuren
im Speichel auf den aeroben Meta-
bolismus von Mundbakterien.
Path. Microbiol. 28: 77 (1965)
- GUGGENHEIM, B.: Streptococci of dental plaques.
Caries Res. 2: 147 (1968)
- GUGGENHEIM, B.: Extracellular polysaccharides
and microbial plaque.
Int. dent. J. 20: 657 (1970)
- VAN HOUTE, J., JANSEN, H.M.: The iodophilic
polysaccharide synthesized by
streptococcus salivarius.
Caries Res. 2: 47 (1968)
- HU, G., SANDHAM, H.J.: Streptococcal utilization
of lactic acid and its effect on pH.
Arch. oral Biol. 17: 729 (1972)
- IKEDA, T., SANDHAM, H.J.: Prevalence of strepto-
coccus mutans on various tooth sur-
faces in negro children.
Arch. oral Biol. 16: 1237 (1973)
- JORDAN, H.V., KEYES, P.H.: In vitro methods for
the study of plaque formation and
caries lessions.
Arch. oral Biol. 11: 793 (1966)

- KLEINBERG, J.: Studies on dental plaque. I. The effect of different concentrations of glucose on the pH of dental plaque in vivo.
J. dent. Res. 40: 1087 (1961)
- KLEINBERG, J., JENKINS, G.N.: The pH of dental plaques in the different areas of the mouth before and after meals and their relationship to the pH and rate of flow of resting saliva.
Arch. oral Biol. 9: 493 (1964)
- KLEINBERG, J.: Formation and accumulation of acid on the tooth surface.
J. dent. Res. 49: 1300 (1970)
- KRASSE, B., JORDAN, H.V., EDWARDSSON, S., SVENSSON, J., TRELL, L.: The occurrence of certain caries-inducing streptococci in human dental plaque material.
Arch. oral Biol. 13: 911 (1968)
- LILIENTHAL, B.: An analysis of the buffer systems in saliva.
J. dent. Res. 34: 516 (1955)
- LILIENTHAL, B.: Buffering systems in the mouth.
Oral surg. 8: 828 (1955)
- LUOMA, H.: Buffer effect of saliva in vitro.
J. dent. Res. 45: 1231 (1966)
- LUOMA, H., LUOMA, A-R.: Modification of the pH of human plaque by sucrose and bicarbonat-phosphat-additives.
Caries Res. 2: 27 (1968)

- MESCHEDE, U.H.: Vergleichende Untersuchungen über
den anaeroben Abbau von Saccharose,
Glukose und Fruktose durch isolierte
Mundhöhlenstreptokokken.
Med. Diss. Erlangen (1969)
- MICHALEK, S.M., MCGHEE, J.R., SHIOTA, T.,
DEVENYNS, D.: Virulence of strepto-
coccus mutans: cariogenicity of s.
mutans in adult gnotobiotic rats.
Infection and Immunity 15: 446 (1977)
- MICHALEK, S.M., MCGHEE, J.R., SHIOTA, T.,
DEVENYNS, D.: Low sucrose levels pro-
mote extensive streptococcus mutans-
induced dental caries.
Infection and Immunity 16: 712 (1977)
- MILLER, B.F., MUNTZ, J.A., BRADEL, S.: Decomposition
of carbohydrate substrates by dental
plaque material.
J. dent. Res. 19: 473 (1940)
- MILLER, W.D.: Die Mikroorganismen der Mundhöhle.
Georg Thieme, Leipzig (1889)
- MONTVILLE, T.J., COONEY, C.L., SINSKEY, A.J.:
Measurement and synthesis of insoluble
and soluble dextran by str. mutans.
J. dent. Res. 56: 983 (1977)
- MOORE, B.W., CARTER, WM.J., DUNN, J.K., FOSDICK, L.S.:
The formation of lactic acid in dental
plaques. I) Caries active individuals.
J. dent. Res. 35: 778 (1956)

- MUHLER, J., SHAFER, W.: Experimental dental caries.
II. Effect of desalivation on dental
caries and castration and desalivation
on fluorine storage in the rat.
J. dent. Res. 33: 346 (1954)
- NEFF, D.: Die Säureproduktion aus verschiedenen
Kohlenhydratquellen in der mensch-
lichen Zahnplaque in situ.
Med. Diss. Zürich (1967)
- ORLAND, F.J., BLAYNEY, J.R., HARRISON, R.W.,
REYNIERS, J.A., TREXLER, P.C.,
WAGNER, M., CORDON, H.A., LUCKEY, T.D.:
Use of the germfree animal technic in
the study of experimental dental caries.
J. dent. Res. 33: 147 (1954)
- ORLAND, F.J., BLAYNEY, J.R., HARRISON, R.W.,
REYNIERS, J.A., WAGNER, M.,
TREXLER, P.C., ERVIN, R.F.,
CORDON, H.A.: Experimental caries
in germfree rats inoculated with
enterococci.
J. Amer. dent. Ass. 50: 259 (1955)
- RANKE, B., BRAMSTEDT, F., NAUJOKS, R.: Unter-
suchungen mit markierten Verbin-
dungen über den Kohlenhydratabbau
in den Plaques.
Advanc. Fluorine Res. and Dental Caries
Prevention Vol. II: 189 (1964)
- RANKE, E., RANKE, B., AHRENS, G., HEESCHEN, W.:
Plaueflora und Zahnkaries. 2. Mit-
teilung: Vorkommen dextranbildender
Streptokokken.
Dtsch. zahnärztl. Z. 24: 880 (1969)

- RANKE, E., RANKE, B.: Zur Bedeutung verschiedener
Plaque-Streptokokken für die Karies.
Dtsch. zahnärztl. Z. 25: 270 (1970)
- ROSEN, S., WEISENSTEIN, P.R.: The effect of sugar
solutions on pH of dental plaques
from caries-susceptible and caries-free
individuals.
J. dent. Res. 44: 845 (1965)
- SAUERWEIN, E.: Kariologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1974)
- SCHLEGEL, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1974)
- SCHMID, F.: Wachstumsverhalten kariogener Strepto-
kokken auf Glukose-Nährböden.
Med. Diss. Erlangen (1974)
- SELLMAN, S.: The buffer value of saliva and its
relation to dental caries.
Acta odont. scand. 8: 244 (1948)
- SHKLAIR, I.L., KEENE, H.J.: A biochemical scheme
for the separation of the five varie-
ties of streptococcus mutans.
Arch. oral Biol. 19: 1079 (1974)
- STEPHAN, R.M.: Hydrogen-ion concentration of
the dental plaque.
J. dent. Res. 17: 251 (1938)
- STEPHAN, R.M.: Changes in hydrogen-ion concen-
tration on tooth surfaces and
cariouss lessions.
J. Amer. dent. Ass. 27: 718 (1940)

- STEPHAN, R.M.: Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity.
J. dent. Res. 23: 257 (1944)
- STEPHAN, R.M., HEMMENS, E.S.: Studies of changes in pH produced by pure cultures of oral microorganisms.
J. dent. Res. 26: 15 (1947)
- DE STOPPELAAR, J.D., VAN HOUTE, J.; BACKER DIRKS, O.:
The relationship between extracellular polysaccharide producing streptococci and smooth surface caries in 13-year old children.
Caries Res. 3: 190 (1969)
- DE STOPPELAAR, J.D.: Streptococcus mutans, streptococcus sanguis and dental caries.
Habilitationsschrift Utrecht (1971)
- STRALFORS, A.: Studies of the microbiology of caries.
III. The buffer capacity of dental plaques.
J. dent. Res. 27: 587 (1948)
- STRALFORS, A.: Investigation into the bacterial chemistry of dental plaque.
Stockholm : Tryckeri, A.B. Thule (1950)
- TANZER, J.M., KRICHEVSKY, M.I., KEYES, P.H.: The metabolic fate of glucose catabolized by a washed stationary phase of caries-conducive streptococcus.
Caries Res. 3: 167 (1969)

- TATEVOSSIAN, A.: Buffering capacity in human dental plaque fluid.
Caries Res. 11: 216 (1977)
- TISCHER, K.: Zur pH-Abhängigkeit des Glukoseabbaues und der Milchsäurebildung isolierter Plaque-Streptokokken.
Med. Diss. Erlangen (1979)
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H., STAUFFER, I.F.:
Manometric Techniques Burgess
Publishing Comp. 4th ed.
Minneapolis (1964)
- WAH LEUNG, S.: A demonstration of the importance of bicarbonate as a salivary buffer.
J. dent. Res. 30: 403 (1951)
- WENDEL, G.: Enzymatische Bestimmung des Glukoseabbaus und der Milchsäurebildung bei gemeinsamer Inkubation isolierter Streptokokkus mutans Stämme.
Med. Diss. Erlangen (noch unveröffentlicht)

Herrn Prof. Dr. Kröncke danke ich für die Überlassung des Themas und die wertvollen Anregungen bei der Bearbeitung. Weiterhin habe ich ihm zu danken, daß er es mir ermöglichte, die Versuche im biochemischen Labor der Klinik und Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie durchführen zu können.

Herrn Dr. Distler, wie auch Frau Degiorgio und Frl. Lechner sage ich Dank für ihre Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Geboren am 3.7.1955	in Eichstätt als Sohn des Post- amtmanns Simon Würth und seiner Ehefrau Frieda, geb. Ganser
ab September 1961	Besuch der Volksschule in Gunzen- hausen
September 1965	Übertritt in das Simon-Marius Gymnasium in Gunzenhausen
22.6.1974	Reifeprüfung
Juli 1974 bis September 1974	Grundwehrdienst in Bad Reichenhall
Oktober 1974	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Universität zu Köln
zum SS 1975	Wechsel an die Friedrich-Alexander- Universität Erlangen-Nürnberg
dort im August 1975	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
im März 1977	Zahnärztliche Vorprüfung
August 1979 bis November 1979	Zahnärztliche Prüfung
13.12.1979	Bestallung als Zahnarzt
seit 28.12.1979	verheiratet mit der Zahnärztin Dr. Gabriele Würth, geb. Wendel

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197